

この説明書をよく読んでから使用してください。

環境衛生検査用



★★ 2010年9月改訂(第5版)
★ 2008年1月改訂(第4版)

レジオネラ検出試薬キット E

【特徴】

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、① 1 種類の酵素のみを使用して遺伝子増幅反応が等温で進行する^{1), 2)}、② 6 領域を認識する 4 種類の Primer を使用するため特異性が高い、③ 増幅効率が高く、短時間に増幅可能である、④ 増幅産物量が多く、簡易検出に適している^{3), 4), 5)}、等の特徴を有する新しい遺伝子増幅法です。

本キットは、LAMP法によるレジオネラ属菌の検出キットで、レジオネラ属菌の保持する 16S rRNA をコードする遺伝子領域内に LAMP 法用のプライマーを設計し開発したものです。プライマーを設定した領域は非レジオネラ属菌とのホモロジーが低く、逆に *Legionella pneumophila* の 11 種の serogroup を含む 11 菌種 21 株のレジオネラ属菌では比較的保存された領域で、LAMP 法で増幅することにより、極めて特異的にレジオネラ属菌を検出することができます。

専用の Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適応機種 LA-320C, RT-160C, LA-200F) を用いることにより、検出に電気泳動を必要とせず、核酸の増幅反応から検出までを閉鎖系 (同一反応チューブ内) で行うことが可能で、従来のレジオネラ属菌検査法⁶⁾ と比較して短時間にレジオネラ属菌を検出することができます^{7), 8)}。

【キット内容】

	48 テスト分
(1) Extraction Solution for <i>Legionella</i> (EX Leg) ^{*1}	1.8 mL × 2 tubes
(2) 1M Tris-HCl : pH7.0 (Tris) ^{*1}	1.0 mL × 1 tube
★★ (3) Reaction Mix. Leg (RM Leg) ^{*1}	1.0 mL × 1 tube
(4) <i>Bst</i> DNA Polymerase (<i>Bst</i> DNA Polymerase) ^{*1}	60 μ L × 1 tube
(5) Positive Control Leg (PC Leg) ^{*1}	0.1 mL × 1 tube

*1: () 内は試薬チューブに記載されている表示です。

【使用目的】

環境水 (温泉水、浴槽水、冷却塔水等) の検水をろ過濃縮法又は冷却遠心濃縮法で処理した 100 倍濃縮検水を検体⁶⁾ としてレジオネラ属菌の検出。

【測定原理】

本キットは、LAMP 法を測定原理として利用しています。

はじめに、濃縮処理した環境水 (濃縮検水) 中の DNA をアルカリ熱抽出後に中和処理した溶液をサンプル溶液とします。このサンプル溶液と Reaction Mix. Leg (RM Leg)、*Bst* DNA Polymerase を混合してインキュベートすると、*Bst* DNA Polymerase の動きによりサンプル溶液中の DNA から増幅反応が進行します。核酸増幅の検出は、増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウム (白色沈殿物質) の濁度の変化によって行い^{3), 4)}、レジオネラ属菌の有無を判定します。

反応原理の詳細については、Eiken GENOME SITE (URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/>) をご覧ください。

なお、本キットは定性検出キットであり、定量測定目的に開発されたものではありません。

【使用方法】

1. 必要な器具・装置 (キットに含まれていませんので、別途用意してください。)

- マスターミックス調製用滅菌チューブ (0.5 mL 又は 1.5 mL)
- ピペット (0.5 ~ 10 μ L, 10 ~ 100 μ L, 100 ~ 1,000 μ L)
- フィルター付きチップ
- 滅菌チューブ (2.0 mL)
- Loopamp 反応チューブ
- 反応チューブ冷却用アルミ製ラック
- 氷 (クラッシュアイス)
- Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適応機種 LA-320C, RT-160C, LA-200F)
- 小型冷却遠心機
- 微量簡易遠心機
- ヒートブロック (95℃で使用)
- ボルテックスミキサー

2. 試薬の調製

- 1) -20℃で保存していた各試薬を室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存します。
- 2) マスターミックスの調製 (氷上で行ってください。)
- (1) 別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに 1 テストあたり Reaction Mix. Leg (RM Leg) 20 μ L、*Bst* DNA Polymerase 1 μ L をそれぞれ必要なテスト数分 (陽性、陰性コントロール分も含む。) 分注します。
- (2) 分注後、チューブを軽く数回叩いて混合する (以下、タッピングと呼ぶ。) か、又は転倒混合、あるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 × 3 回の攪拌により十分混合した後、微量簡易遠心機に数秒かけて (以下、スピンドアウンと呼ぶ。)、これをマスターミックスとします。ボルテックスミキサーでの攪拌は過剰に行うと、酵素が失活する可能性があります。したがって、1 秒間 × 3 回を厳守してください。

なお、調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

3. サンプル溶液の調製 (氷上で行ってください。)

アルカリ熱抽出法⁹⁾ を用いて、検体から DNA 抽出液を得ます。

<アルカリ熱抽出法>

- (1) 検体 (100 倍濃縮検水⁶⁾) 2 mL を別途用意した滅菌チューブ (2.0 mL) に入れ、小型冷却遠心機で 4℃, 13,000×g, 10 分間遠心した後 40 μ L 程度を残し、上清 (約 1,960 μ L) を除去します。
- (2) スピンドアウン後、Extraction Solution for *Legionella* (EX Leg) 50 μ L を添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
- (3) スピンドアウン後、95℃, 15 分間加熱処理して直ちに氷上で冷却します。
- (4) スピンドアウン後、1M Tris-HCl : pH7.0 (Tris) 8 μ L を添加して、ボルテックスミキサーで混合します。

- (5) 小型冷却遠心機で 4℃, 13,000×g, 10 分間遠心した後、氷上に移し上清をサンプル溶液とします。(約 2,000 倍濃縮検水に相当)

4. 操作法

1) マスターミックスとサンプル溶液の混合 (氷上で行ってください。)

- (1) 反応チューブにマスターミックス 20 μ L を分注します。
- (2) サンプル溶液 5 μ L を添加し全量 25 μ L とします。このとき、ピペッティング又はキャップを開めた上でのタッピングにより良く混合した後、スピンドアウンします。また、混合の際は気泡が立たないように注意します。
- (3) また、コントロール反応用には、サンプル溶液の代わりに Positive Control Leg (PC Leg) 5 μ L を添加した陽性コントロールと Extraction Solution for *Legionella* (EX Leg) 5 μ L を添加した陰性コントロールを作製します。

2) リアルタイム濁度検出による増幅反応及び判定

- (1) Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (適応機種 LA-320C, RT-160C, LA-200F) の測定条件を本キット用にあわせませす。設定は次のとおりです。
〔温度〕: 反応ブロック: 65℃, ホットボンネット: 75℃
〔測定時間〕: 60 分
〔酵素失活処理〕: 80℃, 2 分間
なお、操作方法の補足説明については Eiken GENOME SITE (URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/>) 内の製品紹介ページをご参照ください。
- (2) 表示温度が 65℃に達していることを確認します。
- (3) 調製、分注済みの反応チューブをセットして速やかに測定を開始します。
- (4) 装置の表示画面上で陽性コントロールと陰性コントロールの濁度の上昇の有無を確認します。陽性コントロール; Positive Control Leg (PC Leg) で濁度が上昇し、陰性コントロール; Extraction Solution for *Legionella* (EX Leg) で濁度が上昇していない場合は、LAMP 反応は正常に進行しています。それ以外の場合には、増幅反応が適切に進行していない可能性があるため、試薬調製からの再検査を実施してください。(図 1)
- (5) 次に、各検体の判定を行います。増幅反応時間内 (60 分間) に濁度の上昇が認められた場合は「陽性」、濁度の上昇が認められない場合は「陰性」と判定します。(図 2)
- (6) なお、検体によって濁度上昇開始時間や濁度上昇値が陽性コントロール; Positive Control Leg (PC Leg) と異なる場合があります。
- (7) 酵素失活処理 (80℃, 2 分間) (Loopamp リアルタイム濁度測定装置では自動処理されます。) が終了していることを確認した後、装置から使用済み反応チューブを取り出して、そのままキャップを開けずに廃棄してください。

■ 増幅曲線パターン

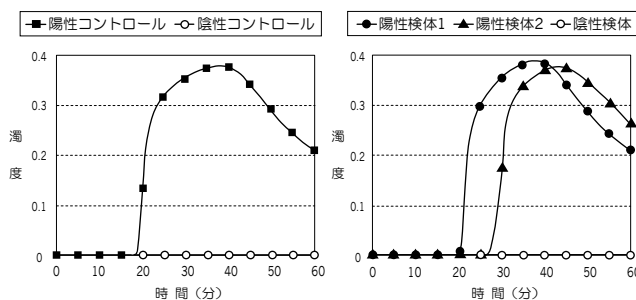


図 1. コントロールの増幅曲線パターン

図 2. 検体の増幅曲線パターン^{*2}

^{*2}: 本キットは定性検出キットであり、定量測定目的に開発されたものではありません。したがって、濁度の立ち上がり時間で、コピー数を特定することはできません。

【操作上の留意事項】

1. サンプルの取扱い

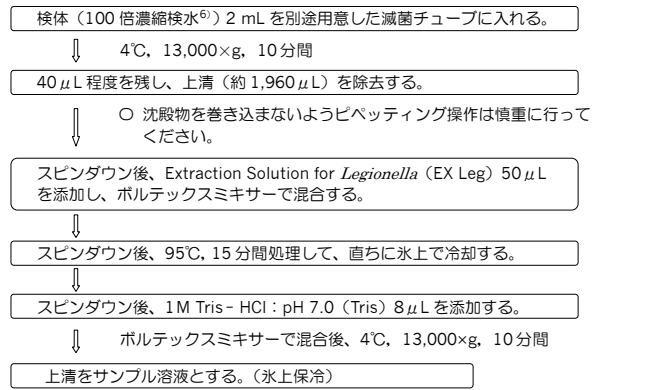
- 1) 100 倍濃縮検水 2mL より 40 μ L 程度を残して上清 (約 1,960 μ L) を除去する際は、沈殿物を巻き込まないようにピペッティング操作は慎重に行ってください。特に沈殿物が多量に存在する場合は、沈殿物の巻き込みに十分注意して操作してください。
- 2) サンプル溶液 (DNA 抽出液) は原則として直ちに測定してください。また、長期に保存する場合は -80℃以下に保存し凍結融解の繰り返しは避けてください。

2. 試薬の取扱い

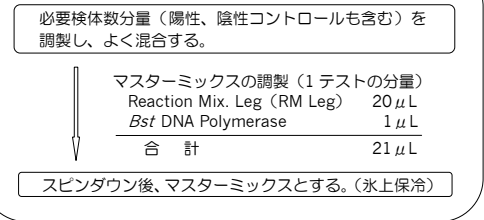
- 1) 本キットは必ず -20℃で保存してください。試薬の劣化を防止するために、使用時には必要な試薬だけを箱から取り出してご使用ください。(凍結融解を 20 回繰り返した結果では、試薬の劣化はほとんど認められておりませんが、無用な凍結融解は品質維持のために避けてください。)
- 2) 試薬の解凍は室温で行い、調製と保存は氷上で行ってください。試薬を使用する際には、一旦スピンドアウンしてチューブの管壁やキャップに付着している試薬を落とした後、十分混合し再度スピンドアウンしてからご使用ください。なお、*Bst* DNA Polymerase は失活する恐れがありますので、激しく攪拌しないでください。
- 3) Positive Control Leg (PC Leg) は高コピー数です。Positive Control Leg (PC Leg) から他のサンプル、試薬へのコンタミネーションを避けるため、取扱う際にはキャップを開ける前に必ずチューブをスピンドアウンし、キャップを開けている時間も必要最小限となるようにしてください。また、反応チューブへの添加は、最後に行ってください。このとき、反応チューブのキャップ (陽性コントロール用反応チューブ以外) はすべて閉まっていることを確認してください。さらに、検査環境へのコンタミネーションを避けるため、Positive Control Leg (PC Leg) は本説明書に記載の操作方法以外での使用 (希釈や検体などへの添加等) は、絶対に行わないでください。
- 4) 陽性コントロール及び陽性と疑われる検体等は、他の試薬と離して取扱ってください。
- 5) 試薬が余った場合、たとえ同一ロットであっても他キットへの使用はしないでください。

■ キット使用 操作 手順

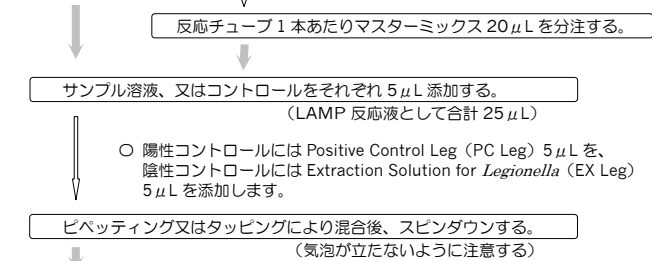
＜検体の前処理：DNA抽出液の調製＞（氷上操作）



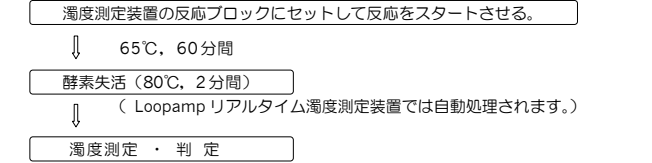
＜マスターミックスの調製＞（氷上操作）



＜操作法＞（氷上操作）



＜LAMP 反応＞



3. 反応チューブの取扱い方法

- リアルタイム濁度検出の場合は、反応チューブは必ず専用の Loopamp 反応チューブをご使用ください。指定以外の反応チューブを使用した場合、光透過性の違いにより誤判定を招く可能性があります。
- 反応チューブは破損しやすいので、取扱いには注意してください。
- 反応チューブは用いる前にキズ・ヒビ等が無いことを目視で確認してください。反応チューブにキズ・ヒビ等があると正しく測定できないばかりか、チューブの破損により装置を汚染する可能性があります。Loopamp リアルタイム濁度測定装置の反応ブロック内でチューブが破損した場合は、反応液が装置本体へ漏出し、除去不能な汚染や故障の原因となります。
- 反応チューブにマスターミックス、サンプル溶液が添加されていることを、他のチューブとの液量比較で確認してください。

4. 増幅反応に際しての留意点

マスターミックスとサンプル溶液を混和後、反応液に気泡が残っていると濁度測定の支障となり誤判定の原因となりますので、気泡が生じないように注意してください。気泡が残っている場合には、スピンドダウンして気泡を取り除いてください。

5. 検出、判定に際しての留意点

- 検出には必ず Loopamp リアルタイム濁度測定装置を用いてください。
- Loopamp リアルタイム濁度測定装置は使用する約 20 分前までに立ち上げてください。
- 判定は、Positive Control Leg (PC Leg) の濁度上昇の有無（核酸の増幅反応が適切に進行している場合、反応開始後 20 分前後から濁度上昇が開始します。）により試薬の反応性を確認した上で行ってください。なお、検体によっては濁度上昇開始時間が陽性コントロールよりも遅れる場合があります。

6. 使用後の反応チューブの取扱い

- 反応後のチューブのキャップは決して開けないでください。特に反応チューブを装置から取り出すときにチューブのキャップが開かないよう、慎重に取り出してください。他検体の増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因となるばかりでなく、検査環境そのものを汚染し、汚染を除去しない限り、以後の検査で正しい結果が得られなくなる可能性があります。

- 反応後のチューブはキャップを開けずに、焼却処理又は密閉できるビニール袋を二重に施し、廃棄の基準に従って処理してください。増幅産物の飛散防止のため、廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないでください。

7. 妨害物質

反応液 25 µL 中、鉄イオンは 3 µmol/L 以上、マンガンイオンは 500 µmol/L 以上で LAMP 反応が阻害されます。多量の金属を含有する温泉水等を検体とする場合、金属イオンの影響により LAMP 反応が阻害される可能性がありますので注意してください。

【性能】

1. 感度・特異性

Legionella pneumophila の 11 種の serogroup を含む 11 菌種 21 株のレジオネラ属菌を特異的に検出することができました。非レジオネラ属菌では、市中肺炎の起因菌を含む 19 菌種 19 株で全く反応しませんでした^{7),8)}。

2. 最低検出感度； 60 CFU (Colony Forming Unit) / test ^{*3}

^{*3}：最低検出感度は、*Legionella pneumophila* の保存菌株を用いた成績です。したがって、実際の環境水を検体に用いた場合には、従来の培養法の性能及び感度と直接比較することはできません。また、*Legionella pneumophila* に関する最低検出感度であり、菌種によっては同様の感度が得られない場合があります。

3. 培養法との関連

浴槽水 100 検体中、培養法でレジオネラ属菌が検出された 49 検体について LAMP 法では全て陽性と判定され、陰性となる不一致は認められていません。また、培養法不検出の 51 検体中 LAMP 法で陽性と判定された検体は 22 検体でした¹¹⁾。

【使用上又は取扱上の注意】

- LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、増幅産物等の DNA がごく微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となる恐れがあります。このようなコンタミネーションを回避するために、サンプル溶液と試薬の調製は別々のクリーンベンチ等を使用して行ってください。なお、電気泳動等での増幅産物の取扱いは避けてください。
- 検体採取・取扱いについては必要なバイオハザード対策をとってください^{6),10)}。
- 反応チューブ、マスターミックス調製用滅菌チューブには UV 照射しないでください。UV 照射による変色等で誤った結果をもたらす場合があります。
- 本キットは、レジオネラ属菌検出を目的とした環境検査にのみご使用ください。ヒト、動物由来検体の医療、臨床診断の目的では使用できません。
- 遺伝子検査の知識や経験をもたない場合、検査結果の判定を誤る危険性がありますので、本キットの使用に当たっては遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導の下で検査を実施してください。
- 本キットは従来のレジオネラ属菌検査法の培養法とは異なり遺伝子検出法ですので、レジオネラ属菌の生菌のみを検出するものではありません。したがって、本キットによる判定結果が培養法と異なる場合があります。自主検査の一環としてご使用ください。
- 本キットの性能に由来しない事由（操作方法を誤った場合等）による誤った判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、当社は一切の責任を負いません。
- 外箱に表示の使用期限（Exp.Date）内に使用してください。
- 本キットの保存温度は－20℃を厳守してください。－20℃より低い温度で保存・凍結融解を繰り返すことにより 1M Tris-HCl : pH7.0 (Tris) チューブに亀裂が入る可能性があります。
- 試薬チューブは P.P.、キットケースは紙を主な材質としています。廃棄の際は医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理してください。

【包装単位・貯蔵方法・有効期間・製品コード】

製 品 名	包装単位	貯蔵方法	有効期間	製品コード
Loopamp®レジオネラ検出試薬キット E	48 テスト分	－20℃	1 年間	LMP 661

【参考文献】

- Notomi T. et al.: Nucleic Acids Research **28**, No.12, e63 (2000)
- Nagamine K. et al.: Clin. Chem. **47**, No.9, 1742–3 (2001)
- 森 安義, 他：第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2000)
- Mori Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, No.1, 150–154 (2001)
- 富田 憲弘, 他：第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2003)
- 厚生省生活衛生局企画課監修：新版レジオネラ症防止指針, 財団法人ビル管理教育センター, 東京 (2000)
- 安中 敏光, 他：日本臨床微生物学雑誌, **13**, No.1, 19–25 (2003)
- 安中 敏光：JARMAM, **14**, No.1, 25–30 (2003)
- Beige, J. et al.: J. Clin. Microbiol. **33**: 90–95 (1995)
- 日本細菌学会バイオセーフティー委員会：日本細菌学雑誌, **54**, No.3, 667–715 (1999)
- 井上 浩章, 他：防菌防霉, **32**, No.10, 481–487 (2004)

* 【問い合わせ先】

栄研化学株式会社 お客様相談窓口
フリーダイヤル ☎ 0120-308-421

* 製造販売元



栄研化学株式会社
栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地